



ペプチド核酸とRNA二重鎖の相互作用解析とRNA検出への応用

著者	佐藤 貴哉
号	74
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	理博第3054号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00121194

論文内容要旨

(NO. 1)

氏 名	佐藤 貴哉	提出年	平成 2 8 年
学位論文の 題 目	ペプチド核酸と RNA 二重鎖の相互作用解析と RNA 検出への応用		

論文目次

第一章 序論

第二章 siRNA 選択性蛍光プローブを用いた細胞内デリバリーイメージング解析

第三章 三重鎖形成ペプチド核酸による RNA 二重鎖結合選択性の解明

第四章 ペプチド核酸と RNA 二重鎖との三重鎖形成反応の速度論的・熱力学的解析

第五章 RNA 二重鎖を配列選択的に検出する蛍光プローブの開発

第六章 RNA 二重鎖選択性向上を目指した蛍光プローブの改良と相互作用解析

第七章 RNA 二重鎖内ピリミジン-プリン反転に選択的に結合する蛍光プローブの結合特性の解明

第八章 結論

論文内容要旨

本博士論文は全八章で構成されている。序論（第一章）では RNA 二重鎖を狙う意義を概観し、本博士論文の目的を記述した。RNA を解析する場合、これまではその一次配列情報を標的としていたが、RNA の高次構造、特に RNA 二重鎖構造は配列と並んで多くの生命現象において重要な役割を担っている。したがって RNA 二重鎖へ結合する分子は、RNA 構造解析・検出ツールとして、あるいは薬剤として活用できると考えられる。また、RNA 二重鎖構造を狙った分子の合理的な開発はいまだ困難であることから、詳細な相互作用解析データは、RNA 二重鎖結合分子の設計に重要な知見を与えられとされる。本博士研究では RNA 結合分子としてペプチド核酸（PNA）に着目し、PNA を基本骨格とした RNA 二重鎖選択的な分子を設計・合成し、その相互作用を詳細に解析することを主な目的とした。また、RNA 二重鎖の構造と配列を直接検出する蛍光プローブの開発へと展開した。

第二章では、核酸医薬として期待される small interfering RNA（siRNA）に選択的な蛍光プローブ：Py-AA-TO を開発した。このプローブは、siRNA 特有の 3'末端オーバーハング 2 塩基に PNA 部位が結合し、その近傍の二重鎖へチアゾールオレンジ（TO）部位が結合することでオフオン型の蛍光応答を

示した。本プローブでアフィニティラベル化した siRNA は、キャリア分子（薬物輸送分子）で内包できることを見出し、一般的なトランスフェクション法によって細胞内へ導入された siRNA/キャリア複合体を選択的に可視化することに成功した。複合体が解消するに従い siRNA からのプローブ解離を伴って徐々に減少していくため、プローブのシグナルを追跡すれば複合体状態の siRNA の取り込みと、複合体の解消を同時にモニタリングすることが可能であった。siRNA へ直接色素を修飾した siRNA ミミックを用いる従来の分析法とは異なり、**Py-AA-TO** によるラベル化法は、医薬としての本来の形と機能を有するナチュラルな siRNA を解析対象とできる点で一線を画している。この性質により、キャリア分子の性能に依存するデリバリー効率と、siRNA によるサイレンシング活性の相関を精密に解析することを可能とした。

第三章から第七章では、PNA による三重鎖形成反応に着目した。三重鎖形成 PNA はそのチミンとプロトン化シトシンが、RNA 二重鎖内の A-U、G-C 塩基対と Hoogsteen 型の水素結合を介して三重鎖を形成し、配列選択的に結合する分子である。従来の三重鎖形成オリゴヌクレオチド (TFO) と比較して、その結合は極めて安定である。さらに、DNA 二重鎖よりも RNA 二重鎖と強く結合する特性が報告されており、これは TFO ではもちろん、他に例のないユニークな結合特性である。そこで第三章では、PNA と RNA 二重鎖ならびに DNA 二重鎖との三重鎖形成反応を詳細に解析し、RNA 二重鎖結合選択性の原因を考察した。PNA-dsRNA 三重鎖は PNA-dsDNA 三重鎖よりも 30°C 以上高い融解温度を示した。この時 CD スペクトル測定から、前者はらせん構造の大きな変化が見られなかったのに対し、後者は元の DNA 二重鎖の B 型構造から A 型構造へ近づくような、顕著な構造変化を伴うことが分かった。また RNA 二重鎖に対しては、会合定数が 2.6 倍、会合速度定数が 4.4 倍大きかったことから、PNA-dsRNA 三重鎖形成は特に会合過程が有利であることが示唆された。これらの結果から、(1) DNA 二重鎖に比べてリジッドな RNA 二重鎖へ結合できる、PNA の構造的にフレキシブルな骨格; (2) DNA 鎖が RNA 鎖よりも糖のバックリングの変化を付随するコンフォメーション変化をしやすい性質; (3) A 型構造の主溝と PNA の構造的な相性、が RNA 二重鎖結合選択性を生み出したと結論付けた。

第四章では、PNA と RNA 二重鎖との三重鎖形成の反応機構とミスマッチの影響を明らかにするため、速度論・熱力学の観点から三重鎖形成反応を詳細に調べた。会合速度定数の温度依存性をアレニウスの式で解析したところ、三重鎖形成反応は負の活性化エネルギーを示すことが分かり、nucleation-zipping モデルで進行することが示唆された。しかしミスマッチが配列中の中央、末端のいずれにあっても会合速度定数は同程度減少したことから、核形成は配列中のどの部分でも起こり、伸長反応は双方向へと進行することが示唆された。これはアキラルな PNA 特有の結合特性であることが分かった。三重鎖形成反応は大きな負のエンタルピー変化に駆動されており、その大部分が負のエントロピー変化によって打ち消される、エンタルピー・エントロピー補償則が強く働いていた。また熱力学のパラメータは温度に大きく依存しており、大きな負の比熱容量変化を示した。これは、三重鎖形成反応が一本鎖状態の PNA のコンフォメーション変化と RNA 二重鎖への結合の 2 つの平衡がカップリングした反応機構で成り立っていることを示唆していた。ミスマッチ含有配列に対しては、ギブス自由エネルギー変化よりもエンタルピー変化が顕著に影響を受け、特にミスマッチが配列中央にある時に正に小さくなった。第四章で得られた結果は、PNA による三重鎖形成反応の熱力学・速度論的データを包括的に解析した重要なデータであり、より配列選択性の高い PNA を設計していく上で役立つと考えられる。

三重鎖形成 PNA は RNA 二重鎖と安定にかつ配列選択的に結合できる性質を有するため、RNA 二重鎖を狙った分子ツールとして様々な応用が期待できる。第五章から第七章では、特に RNA 二重鎖を配

列選択的に検出する蛍光プローブの開発を行った。第五章では、具体的に三重鎖形成 PNA の塩基を TO に置き換えたプローブ: tFIT (triplex-forming forced intercalation of thiazole orange) プローブを開発した。プローブが標的 RNA 二重鎖と三重鎖を形成すると、TO 部位の蛍光強度は最大 470 倍増大した。tFIT プローブの会合速度定数は従来の TFO と比較して 2 桁大きいことが特長であり、これにより蛍光応答が極めて迅速で標的 RNA のリアルタイム検出を可能とした。これは従来の TFO をベースとした分子設計では獲得し得ないセンシング能と言える。プローブの蛍光応答は配列選択的であり、標的配列をミスマッチ含有配列から 1 塩基対レベルの高い精度で識別することができた。さらに TO 擬塩基はいかなる対面塩基対に対しても結合でき、かつ蛍光応答を示すことから蛍光性のユニバーサル塩基として機能することも見出した。これは TO 擬塩基を組み込むことで、従来の三重鎖形成反応のホモプリン配列に限定される標的配列を、ピリミジーンプリン塩基対含有配列にも拡大できることを示唆していた。これまでの RNA 蛍光検出法は、核酸プローブやタンパク質プローブによる RNA 一本鎖部位への結合に基づくものであったため、RNA 二重鎖の構造と配列を直接検出できる点で、従来法とは一線を画した解析法となる。

第六章では、tFIT プローブの TO 擬塩基のリンカーの効果について考察し、アセチルリンカーをプロピルリンカーへと置換することで RNA 二重鎖に対する結合選択性を向上させることに成功した。プロピルリンカーで連結した TO 擬塩基は、三重鎖を形成すると対面の二重鎖とより効果的に相互作用できるため、蛍光応答は保ったまま高い結合親和性を示した。さらに、リンカーを導入したことでプローブが二重鎖形成した場合には TO 擬塩基が二重鎖内へと収納されづらくなるため、安定性も蛍光応答も共に減少した。本分子設計は TO 擬塩基部位に RNA 二重鎖 vs. RNA 一本鎖選択性を持たせた点で重要であり、大量の非標的一本鎖 RNA が存在する系（ホモジニアスアッセイや細胞内イメージング）へと本プローブを展開していく上で強力な手法である。

TO 擬塩基のリンカー導入による親和性の増大は、短い tFIT プローブに対しても有効であった。第七章では、わずか 6 塩基長のプロピルリンカーで連結した TO 擬塩基を含む tFIT プローブが、ピリミジーンプリン塩基対を含む RNA 二重鎖配列に対して、nM オーダーの解離定数で結合できることを初めて示した。この時 200 倍を超える蛍光強度の増大が観測された。これほどまで短い二重鎖部位を配列選択的に狙うことは、従来の TFO では成し得ないものである。さらに蛍光寿命測定から、結合したプローブ TO 部位は複数の化学種として存在しており、それらの存在比がプローブの結合力や蛍光応答を決めることを明らかにした。RNA へ結合した TO の寿命測定データはほとんどなく、特に三重鎖へ結合した TO を調べた例はないため、本章のデータは TO の分光特性に関する貴重なデータでもある。

第八章では、本博士研究を総括した。本博士研究では、RNA 二重鎖選択的な PNA ベースの合成分子群の結合能を分光学的・熱力学的・速度論的・計算法的・生化学的手法を用いて包括的に調べた。さらに、RNA 二重鎖へ選択的に結合する蛍光プローブ群を世界に先駆けて開発し、RNA 二重鎖を直接可視化することでその局在や機能を解析するという、これまでにない新しい分析手法を示した。

別 紙

論文審査の結果の要旨

本博士論文は、全八章から構成されており、ペプチド核酸（PNA: peptide nucleic acid）と RNA 二重鎖との相互作用解析及び RNA 二重鎖の構造や配列を直接検出する蛍光プローブの合成と機能に関する研究成果が述べられている。

第一章（序論）では、RNA 二重鎖を狙う意義を概観し、本博士論文の目的が記述されている。

第二章では、small interfering RNA (siRNA) に選択的な蛍光性 PNA プローブの設計・合成と機能について述べられている。siRNA に可逆的に結合し、かつ明瞭な light-up 応答を示す蛍光プローブは世界的にも例がなく、本プローブにより細胞内の siRNA デリバリー過程を可視化できることを示している。

第三章では、RNA 二重鎖結合選択性の起因を考察するために、PNA と RNA 二重鎖ならびに DNA 二重鎖との三重鎖形成反応を詳細に解析している。その結果、(1) PNA の構造的にフレキシブルな骨格; (2) DNA 鎖が RNA 鎖よりも糖のパッカリングの変化を付随するコンフォメーション変化をしやすい性質; (3) A 型構造の主溝と PNA の構造的な相性、が RNA 二重鎖結合選択性を生み出したと結論付けている。

第四章では、PNA と RNA 二重鎖との三重鎖形成の反応機構とミスマッチの影響を明らかにするため、速度論・熱力学の観点から三重鎖形成反応を詳細に検討している。その結果、PNA による三重鎖形成反応は nucleation-zipping モデルに基づく反応機構で進行することを初めて明らかにするとともに、三重鎖形成反応における PNA の初期構造の考察の重要性も指摘している。

第五章では、RNA 二重鎖を配列選択的に検出する蛍光性 PNA プローブの設計・合成と機能について述べられている。tFIT (triplex-forming forced intercalation of thiozole orange) と名付けられた本プローブは、本研究により世界に先駆けて提案されたもので、従来、困難とされてきた RNA 二重鎖構造（塩基配列）の迅速な検出が可能であることを示している。

第六章では、tFIT プローブの機能改良を目的として、一連の tFIT プローブを設計・合成し、その機能を評価している。その結果、蛍光色素と PNA 骨格を連結するリンカー長を最適化することで、結合力を向上させることに成功している。

第七章では、短い tFIT プローブの設計・合成と機能について述べられている。ここでは、わずか 6 塩基長の tFIT プローブが、ピリミジーン-プリン塩基対を含む RNA 二重鎖配列に対して、nM オーダーの解離定数で結合できることを初めて示している。

第八章（結論）では、本研究で得られた知見を総括している。

以上の研究成果は、論文提出者が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。したがって、佐藤貴哉君提出の博士論文は、博士(理学)の学位論文として合格と認める。